

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTÈRE DE L'INDUSTRIE

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

COPIE OFFICIELLE

RECEIVED

88 SEP -7 AM 8:38

GROUP 180

LE DOCUMENT CI-ANNEXÉ EST LA COPIE CERTIFIÉE CONFORME,
D'UNE DEMANDE DE TITRE DE PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
ENREGISTRÉE A L'INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE.

PUBLIE

LE TITRE A ÉTÉ [REDACTED] LE.....

23 décembre 1983

ÉTABLIE A PARIS, LE... 23 MARS 1988.....

Pour le Chef de Service
Directeur de l'Institut national
de la propriété industrielle

A handwritten signature in cursive script.

Y. CAMPENON

DEMANDE DE
(voir case cochée)

- ☒ BREVET D'INVENTION ☐ CERTIFICAT D'ADDITION
☒ CERTIFICAT D'UTILITÉ ☐ DEMANDE DIVISIONNAIRE
☐ TRANSFORMATION D'UNE DEMANDE DE BREVET EUROPÉEN.

DATE DE
REMISE
DES PIÈCES

22 JUN 1982

DATE DE
DÉPÔT

22-06-82

N° D'ENREGISTREMENT
NATIONAL

82 10892

COJE POSTAL DU LIEU DE DÉPÔT

DÉPÔT POSTAL - 99

DUPLICATA DE LA REQUÊTE

RATTACHEMENT DE LA DEMANDE DIVISIONNAIRE OU DE LA TRANSFORMATION
NATURE, N° ET DATE DE LA DEMANDE INITIALE.

NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

Cabinet PLASSERAUD?
84, rue d'Amsterdam,
75009 PARISRÉFÉRENCE DU DEMANDEUR
OU DU MANDATAIRE:

CHP.MTP 99 82 01

DATE DU POUVOIR GÉNÉRAL ET NUMÉRO
DE TÉLÉPHONE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE:

1) TITRE DE L'INVENTION

"Nouveaux dérivés de tétrasaccharides et leur préparation"

NOMBRE DE
RENDICATIONS:

2) DEMANDEUR: NOM ET PRÉNOMS OU DÉNOMINATION ET FORME JURIDIQUE:

N° SIRENE, LE CAS ÉCHÉANT

: 1

CHOAY s.a.

3) NATIONALITÉ:

française

4) ADRESSE COMPLÈTE:

PAYS

48, avenue Théophile Gautier, 75782 PARIS

FRANCE

5) INVENTEUR

LE DEMANDEUR EST
L'INVENTEUR

NON

6) LE DEMANDEUR REQUIERT QUE
L'ÉTABLISSEMENT DE L'AVIS
DOCUMENTAIRE SOIT DIFFÉRÉ

OUI

LE DEMANDEUR REQUIERT LE
BÉNÉFICE DU PAIEMENT ÉCHELONNÉ
DE LA TAXE D'AVIS DOCUMENTAIRE

NON

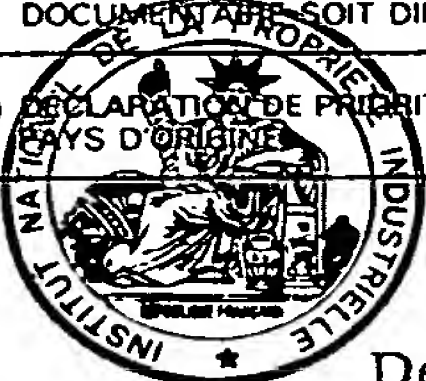
LE DEMANDEUR BÉNÉFICIE
POUR L'INVENTION CONCERNÉE, D'UNE DÉCISION
DE RÉDUCTION DES TAUX DE TAXE

NON

7) DÉCLARATION DE PRIORITÉ
PAYS D'ORIGINE

DATE DE DÉPÔT

NUMÉRO

Demande de Certificat d'Utilité résultant de la transformation
de la demande de brevet déposée le 22-6-82
(Article 20 de la Loi du 2 Jan. 1968 modifiée et articles 42 et 43
du Décret du 19 Septembre 1979)

8) RATTACHEMENT DU CERTIFICAT D'ADDITION:

NATURE DE LA DEMANDE PRINCIPALE:

N°

DATE DE DÉPÔT:

ADDITIONS ANTERIEURES: 1^{er} N°2^e N°3^e N°4^e N°SIGNATURE
DU DEMANDEUR
OU
DE SON
MANDATAIRE

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT
DE LA DEMANDE À L'IN.P.I.

CODE POSTAL DU LIEU DE DEPOT

DEPOT POSTAL - 99

RATTACHEMENT DE LA DEMANDE DIMENSIONNAIRE OU DE LA TRANSFORMATION
NATURE, N° ET DATE DE LA DEMANDE INITIALE:

NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

Cabinet PLASSERAUD?
84, rue d'Amsterdam,
75009 - PARIS

N° PUBLICATION 2 528 854

(21) N° ENREGISTREMENT NATIONAL 82 10892

NATURE DU DOCUMENT A1 DEMANDE

DE BREVET D'INVENTION

(22) DATE DE DEPOT 22 JUIN 1982

(41) BOPI DEMANDE N° 51 DU 23/12/83

DATE DE DELIVRANCE

(47) BOPI DELIVRANCE N°

(51) CLASSIFICATION INTERNATIONALE CLASST 3

DAT REN DES CC7H 17/04 ;

N° NAT CERTIFICAT D'UTILITE

1) TITRE DE L'INVENTION (54)

"Nouveaux dérivés de tétrasaccharides et leur préparation"

2) DEMANDEUR: NOM ET PRENOMS OU DENOMINATION ET FORME JURIDIQUE: (71)

N° SIRENE, LE CAS ECHÉANT

: 1

CHOAY s.a.

4) ADRESSE COMPLETE:

PAYS

5) INVENTEUR (72)

LE DEMANDEUR EST
L'INVENTEUR :

7) DECLARATION DE PRIORITE (30)

DATE DE DEPOT (32)

NUMERO (33)



Demande de Certificat d'Utilité résultant de la transformation
de la demande de Brevet déposée le 22-6-82
(Article 20 de la Loi du 2 Janvier 1968 modifiée et articles 42 et 43
du Décret du 19 Septembre 1979)

8) RATTACHEMENT DU CERTIFICAT D'ADDITION:

NATURE DE LA DEMANDE PRINCIPALE :

ADDITIONS ANTERIEURES : 1° N°

2° N°

N°

3° N°

Nbre
P. de G. (Rec)
P. de G. (Pub)
Des et Rev
Avis Doc
Pl. de Dessin
D. Inventeurs
Abrégé
TOTAL

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)
ChP.MTB- 99-82-01

N° d'enregistrement national

82-10892

Titre de l'invention :

"Nouveaux dérivés de tétrasaccharides et leur préparation"

La (s) soussigné(s)

CHOAY s.a.

48, avenue Théophile Gautier,
75782 - PARIS CEDEX 16

représentée par son mandataire le

CABINET PLASSERAUD, 84, rue d'Amsterdam, 75009 - PARIS -

désigne (nt) en tant qu'inventeur (s) (nom, prénoms, adresse)

Jean CHOAY,
21, rue Saint-Guillaume,
75007 - PARIS-

Jean-Claude JACQUINET,
1, allée André Gide,
45100 - ORLEANS-la-SOURCE

Maurice PETITOU,
27, rue du Javelot, Appart. 201
75645 - PARIS CEDEX 13 -

Pierre SINAY,
5, rue Jacques Monod,
45100 - ORLEANS -



Date et 22.06.1982

signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

CABINET PLASSERAUD

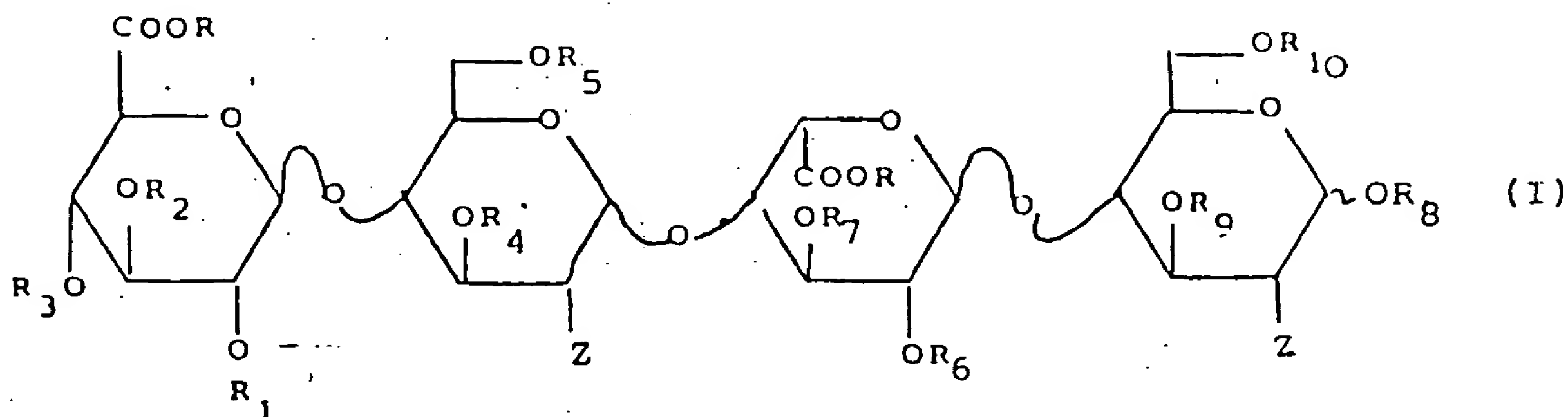
Par Procuration

Henry

"Nouveaux dérivés de tétrasaccharides et leur préparation"

L'invention a pour objet de nouveaux dérivés de tétrasaccharides et leur préparation.

Elle concerne plus particulièrement des tétrasaccharides formés d'un enchaînement de motifs à structure acide glucuronique, D-glucosamine, acide L-iduronique et D-glucosamine, de formule



dans laquelle :

- 10 - R_4, R_5, R_6 et R_{10} représentent un atome d'hydrogène, un groupe sulfate, ou un groupe protecteur, l'un au moins de ces radicaux représentant alors dans ce dernier cas un atome d'hydrogène ou un groupe sulfate,
- 15 - R_1, R_2, R_3, R_7, R_8 et R_9 représentent un atome d'hydrogène ou un groupement protecteur,
- les substituants R , identiques ou différents représentent un groupe alcoyle, en particulier renfermant 1 à 3 atomes de carbone, de préférence un groupe méthyle, ou un cation métallique, notamment le sodium, ou encore un cation organique, tel qu'un dérivé de base organique azotée,
- Z représente un précurseur d'un groupement fonctionnel azoté ou ce groupement azoté lui-même, en particulier un groupe azide, un groupement amine, éventuellement substitué, ou un groupe $-NHSO_3^-$.

25 Une famille préférée de tétrasaccharides de l'invention renferme avantageusement deux motifs D-glucosamine comportant un groupe N-sulfate en position 2.

Des tétrasaccharides de ce type sont, en outre, avantageusement substitués en position 6 par un groupe -O sulfate.

30 Dans d'autres tétrasaccharides préférés, R_4 représente un groupe sulfate, cette disposition pouvant avantageuse-



ment s'ajouter à celles qui précèdent.

Dans une autre famille préférée, les tétrasaccharides ci-dessus renferment en outre un motif acide L-iduronique comportant un groupe O-sulfate en position 2.

Les positions restantes de ces tétrasaccharides sont libres ou protégées par des groupements de blocage selon l'application envisagée pour ces produits.

D'une manière avantageuse, ces tétrasaccharides correspondent à des séquences de fractions ou fragments de chaînes d'héparine douées d'une activité anticoagulante spécifique élevée (mesurée selon la méthode de Yin-Wessler décrite dans J.Lab.Clin.Med. 1976, 81, 298-300) _____ tandis que leur activité anticoagulante globale (exprimée par le titre USP, mesuré selon la méthode décrite dans "Pharmacopea of the United States of America" pp 229-230) est plus faible que celle de l'héparine. Ces tétrasaccharides sont donc avantageusement utilisables comme substances de référence pour des études de structure.

Ils constituent également des produits intermédiaires de grand intérêt en synthèse osidique, plus spécialement pour la synthèse d'oligosaccharides constitutifs de chaînes d'héparine ou d'héparan-sulfates.

Conformément à l'invention, le ou les groupes -O-sulfate des motifs constitutifs des tétrasaccharides sont obtenus à partir de groupements -O-acétyle ($-O-COCH_3$). Dans une première étape, on procède à l'élimination partielle de groupes -O-acétyle, par exemple à l'aide de carbonate de potassium dans du méthanol, ou à une élimination complète de tous les groupements -O-acétyle du tétrasaccharide à l'aide, par exemple, de soude. Les groupes -OH ainsi libérés sont alors soumis à un traitement de sulfatation. A cet effet,



on utilise, par exemple, un complexe de tétraméthylamine /SO₃.

Les groupes -N-sulfate sont avantageusement obtenus par sulfatation de groupes amine.

5 Comme produit de départ, on met avantageusement en oeuvre un tétrasaccharide, tel qu'obenu selon le procédé décrit dans la demande de brevet _____

10 FR 82 02526 du 16 février 1982 au nom de la Demanderesse. Dans ce tétrasaccharide, les groupes de blocage sont convenablement choisis selon le type de substitution souhaité dans le produit final.

15 Ainsi, on a plus spécialement recours à un tétrasaccharide comportant des groupes -OCOCH₃ sur les positions à sulfater et des groupes de blocage inertes vis-à-vis de la réaction de désacétylation et de sulfatation et compatibles entre eux pour les autres positions.

Les produits intermédiaires mis en oeuvre dans le procédé évoqué ci-dessus sont nouveaux et, en tant que tels, entrent également dans le cadre de l'invention.

20 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans les exemples qui suivent relatifs à la synthèse de tétrasaccharides de l'invention. Le schéma de synthèse est représenté sur la figure. Les composés y sont désignés par les mêmes numéros que dans les exemples. Les symboles utilisés dans la description et la figure ont les significations suivantes :

Ac : acétyle, Me : méthyle, Bn : benzyle, S : SO₃⁻,
ido : motif iduronique, gluco : motif glucosamine,
30 TMA : triméthylamine, A : benzyloxycarbonyle.

EXEMPLE 1 - Synthèse du tétrasaccharide 2 -

35 Une solution de tétrasaccharide 1 (28mg) dans le méthanol anhydre (3ml) est refroidie à -15°C sous atmosphère d'argon sec. Du carbonate de potassium anhydre (12 mg) est ajouté et le mélange est agité



6 heures dans ces conditions. Les solides sont alors essorés, le filtrat est évaporé et le résidu est repris avec du chloroforme (15 ml). La phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium, avec de l'eau, séchée (sulfate de sodium), filtrée et évaporée.

Le résidu est chromatographié sur une colonne de gel de silice (2 g). L'élution par le mélange acétate d'éthyle/hexane (3:2, v/v) donne le tétrasaccharide 2 sous forme d'un verre incolore (22mg, 85%). Spectre RMN (270 MHz, CDCl_3) : δ : 7,30 (m, 35H, 7 Ph) ; 5,37 (d, 1H, H_1'' , $J_{1''}$, $2''$: 3,5 Hz) ; 5,29 (d. de d., 1H, H_3' , $J_{2''}$, $3''$: 10 Hz, $J_{3''}$, $4''$: 8,5 Hz) ; 5,09 (d, 1H, H_1' , $J_{1,2}$: 3,5 Hz) ; 3,57 (s, 3H, COOMe ido) ; 3,43 (s, 3H, COOMe gluco) ; 2,06 (s, 3H, OAc).

Ce composé 2, qui est un dérivé mono-O-acétylé (en position 3 sur le 2ème motif) du tétrasaccharide 6, est un intermédiaire potentiel pour la synthèse d'un analogue de ce tétrasaccharide qui ne serait pas sulfaté sur la position 3 du deuxième motif.

EXEMPLE 2 - Synthèse du tétrasaccharide 3 -

Une solution du tétrasaccharide 1 (40 mg) dans un mélange de 1,2-diméthoxyéthane (3 ml) et de méthanol (1ml) est refroidie à -15°C . Une solution aqueuse M de soude (1 ml) est ajoutée goutte à goutte en 10 mn. et le mélange réactionnel est agité 5 heures à 0°C . De l'acide chlorhydrique M est alors ajouté goutte à goutte jusqu'à pH = 0 et le mélange est versé dans de l'eau glacée (50 ml). Après extraction avec du chloroforme (5 fois 5 ml), les phases organiques sont lavées avec de l'eau, séchées (sulfate de sodium) filtrées et évaporées.



Le résidu est dissous dans du méthanol (1 ml) et traité par une solution étherée de diazométhane jusqu'à persistance de la coloration jaune. Après 30 mn, le mélange réactionnel est évaporé à sec. Le résidu est chromatographié sur une colonne de gel de silice (3 g). L'élution par le mélange acétate d'éthyle/hexane (2:1, v/v) donne le tétrasaccharide 3 (27 mg, 75%) ; P.F 126-127°C (éthanol) ; $[\alpha]_D^{20} = + 55^\circ$ (cl, chloroforme).

Spectre RMN (90 MHz, CDCl_3) : absence totale de signaux OAc (vers $\delta = 2$).
Analyse élémentaire : conforme avec la structure recherchée.

EXEMPLE 3 : Synthèse du tétrasaccharide 4.

A une solution du dérivé 3 (24 mg) dans le DMF (1 ml), on ajoute le complexe TMA/ SO_3 (24 mg). Après une nuit à 50°C, la réaction de sulfatation est complète.

Du méthanol (0,5 ml) est ajouté au mélange réactionnel puis celui-ci est déposé sur une colonne de Séphadex LH-20 équilibrée en chloroforme méthanol (1:1, v/v). Les fractions contenant 4 sont regroupées. Après évaporation à sec, le résidu est chromatographié sur gel de silice (10 g) dans le mélange acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (160:77:19:42 ; v/v/v/v). Les fractions pures sont regroupées. Après concentration à sec, le résidu est passé au travers d'une colonne Dowex 50W x 4, Na^+ éluée avec de l'eau. Le produit obtenu (30 mg) est homogène en chromatographie sur couche mince dans le solvant ci-dessus. Son spectre RMN confirme la structure.

$[\alpha]_D^{20} = + 39^\circ$ (1, méthanol).
EXEMPLE 4 - Synthèse du tétrasaccharide 5 -

Une solution du dérivé 4 (10 mg) dans un mélange de méthanol (1,8 ml) et d'eau (0,2 ml) est agitée sous une pression d'hydrogène de 0,2 bar en présence de Pd/C à 5% (10 mg). Après 96 heures, le cata-



lyseur est éliminé par filtration. L'analyse en ultra-violet confirme l'absence de noyaux aromatiques. Après évaporation, le dérivé 5 est utilisé tel quel pour la préparation du dérivé 6.

5 EXEMPLE 5 - Synthèse du tétrasaccharide 6 -

Le dérivé 5 obtenu à l'étape précédente, est dissous dans l'eau (2 ml). Le pH de cette solution est ajusté à 9,5 ; il est maintenu à cette valeur pendant toute la durée de la sulfatation. Le complexe TMA/SO₃ (14 mg) est ajouté. Une deuxième addition est faite après 10 24 heures (14 mg). Après 48 heures, le pH est amené à 12, puis à 7, deux heures plus tard. Le mélange réactionnel est alors chromatographié sur une colonne de Séphadex G-25 (50 ml). Les fractions contenant le dérivé 6 15 (détection par réaction colorée des acides uroniques) sont regroupées, passées au travers d'une colonne de résine Dowex 50 W x 4 Na⁺ puis lyophilisées.

On obtient ainsi le tétrasaccharide 6 (2 mg).

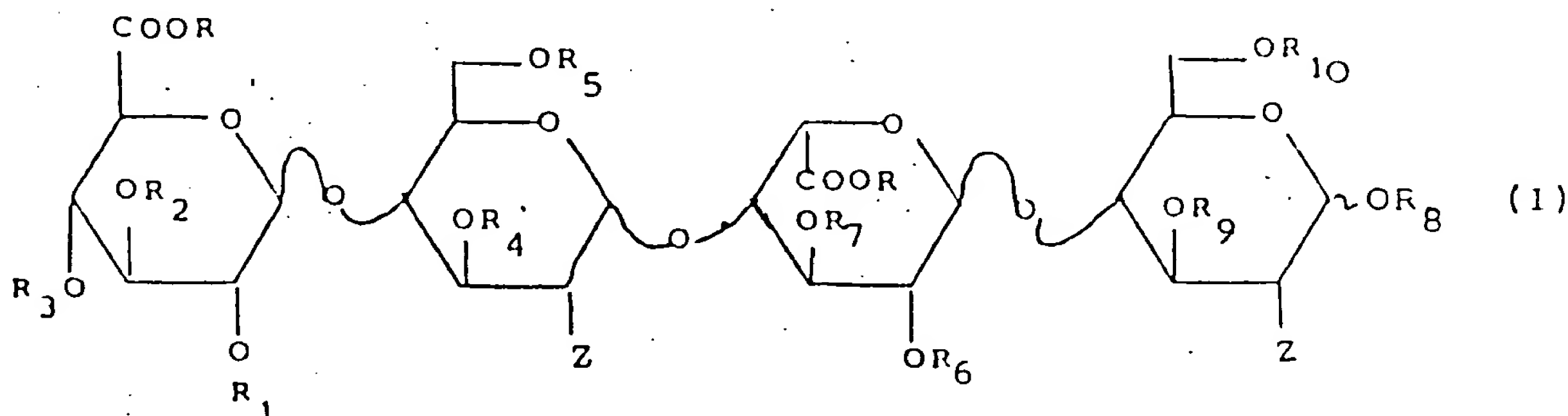
L'analyse colorimétrique des constituants 20 du dérivé 6 donne 1,84 moles de glucosamine pour 2,06 moles d'acides uroniques.

La structure du dérivé 6 (séquence, anomérie, position des groupes sulfates) est confirmé par le spectre RMN (270 MHz, TMS) : δ pour les protons anomères respectivement des 1er, 2ème, 3ème et 4ème motifs , 4,72 ; 5,30 ; 5,55 ; et 5,67.



REVENDICATION

5 Tétrасaccharides formés d'un enchaînement de motif à structure acide glucuronique D-glucosamine, acide L-iduronique et D-glucosamine, caractérisés en ce qu'ils répondent à la formule. :



dans laquelle :

- 10 - R_4, R_5, R_6 et R_{10} représentent un atome d'hydrogène, un groupe sulfate, ou un groupe protecteur, l'un au moins de ces radicaux représentant alors dans ce dernier cas un atome d'hydrogène ou un groupe sulfate,
- 15 - R_1, R_2, R_3, R_7, R_8 et R_9 représentent un atome d'hydrogène ou un groupement protecteur,
- les substituants R, identiques ou différents représentent un groupe alcoyle, en particulier renfermant 1 à 3 atomes de carbone, de préférence un groupe méthyle, ou un cation métallique, notamment le sodium, ou encore un cation organique tel qu'un dérivé de base organique azotée.
- Z représente un précurseur d'un groupement fonctionnel azoté ou ce groupement azoté lui-même, en particulier un groupe azide, un groupement amine, éventuellement substitué, ou un groupe $-NHSO_3^-$.



FIGURE

